

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-255486

(43) 公開日 平成7年(1995)10月9日

(51) Int.Cl. ^a	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 Q 1/68	A	9453-4B		
// C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
		9281-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 21 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-51739

(22) 出願日 平成6年(1994)3月23日

(71) 出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72) 発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ

ノン株式会社内

(74) 代理人 弁理士 若林 忠

(54) 【発明の名称】 新規核酸断片およびこれらを用いた *Pseudomonas cepacia* KK01株の検出法

(57) 【要約】

【目的】 *Pseudomonas cepacia* KK01株の正確な検出。

【構成】 *Pseudomonas cepacia* KK01株の16S rRNA遺伝子から抽出した特異配列をプライマーまたはプローブとして用いて検出する。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の塩基配列で示される *Pseudomonas cepacia* KK01株の16S rRNA遺伝子。

【請求項2】 請求項1の配列で示される核酸、ならびに、その相補的な塩基配列を有する核酸、および、これらの変異配列で示される核酸から選ばれる新規な核酸断片*

*片。

【請求項3】 次に列記する特異配列番号1から8までのいずれかの配列またはそれら配列のいずれかを一部として含むことを特徴とする請求項2に記載の新規な核酸断片。

【表1】

特異配列1 (配列番号1における塩基番号56から231までの176塩基)

CGAACGGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGA-
GTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCG-
GATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCT-
CGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTG

特異配列2 (配列番号1における塩基番号422から492までの71塩基)

GCACCTTTTGTCGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGA-
CGGTACCGGAAGAATAAGCAC

特異配列3 (配列番号1における塩基番号567から752までの186塩基)

TGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG-
GAACTGCATTGGTACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT-
TCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCG-
AAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCA

特異配列4 (配列番号1における塩基番号811から866までの56塩基)

TCAACTAGTTGTTGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGA-
AGTTGA

特異配列5 (配列番号1における塩基番号974から1034までの61塩基)

TACCCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGA-
GAACCGGCGCA

特異配列6 (配列番号1における塩基番号1105から1137までの33塩基)

TTGTCCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAG

特異配列7 (配列番号1における塩基番号1182から1352までの171塩基)

GTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAATGGTCGGA-
ACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCAGAAAACCGATCG-
TAGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAG-
TAATCGCGGATCAGCATGCCG

特異配列8 (配列番号1における塩基番号1405から1458までの54塩基)

GGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACG-
GTAG

【請求項4】 請求項3に記載のいずれかの核酸中の部分配列であってプライマー、またはプローブとして利用可能な核酸よりなる新規な核酸断片。

【請求項5】 プライマーとして利用可能な核酸が10～50塩基の長さであり、プローブとして利用可能な核酸が10塩基から請求項2に記載の核酸の全塩基数以下の長さである請求項4に記載の新規な核酸断片。

【請求項6】 部分配列が次に配列する部分配列番号1から437までのいずれかである請求項4に記載の新規な核酸断片。

【表2】

部分配列番号	塩基配列
1	AACCGCAAGGAGGACG
2	TAACCGCAAGGAGGACG
3	TAACCGCAAGGAGGAC
4	CTAACCGCAAGGAGGACG
5	CTAACCGCAAGGAGGAC
6	CTAACCGCAAGGAGGA
7	TCTAACCGCAAGGAGGACG
8	TCTAACCGCAAGGAGGAC
9	TCTAACCGCAAGGAGGA
10	TCTAACCGCAAGGAGG
11	GTCTAACCGCAAGGAGGACG
12	GTCTAACCGCAAGGAGGAC
13	GTCTAACCGCAAGGAGGA
14	GTCTAACCGCAAGGAGG
15	GTCTAACCGCAAGGAG
16	AGTCTAACCGCAAGGAGGACG
17	AGTCTAACCGCAAGGAGGAC
18	AGTCTAACCGCAAGGAGGA
19	AGTCTAACCGCAAGGAGG
20	AGTCTAACCGCAAGGAG
21	AGTCTAACCGCAAGGA
22	GCTGGAATCGCTAGTAATCG
23	GCTGGAATCGCTAGTAATCG
24	ATGAAGCTGGAATCGC
25	CATGAAGCTGGAATCGC
26	CATGAAGCTGGAATCG
27	GCATGAAGCTGGAATCGC
28	GCATGAAGCTGGAATCG
29	GCATGAAGCTGGAATC
30	TGCATGAAGCTGGAATCGC
31	TGCATGAAGCTGGAATCG
32	TGCATGAAGCTGGAATC
33	TGCATGAAGCTGGAAT
34	GTGCATGAAGCTGGAATCGC
35	GTGCATGAAGCTGGAATCG
36	GTGCATGAAGCTGGAATC
37	GTGCATGAAGCTGGAA
38	AGTGCATGAAGCTGGAATCGC
39	AGTGCATGAAGCTGGAATCG
40	AGTGCATGAAGCTGGAATC
41	AGTGCATGAAGCTGGAAT
42	AGTGCATGAAGCTGGA

【表3】

10

20

30

部分配列番号	塩基配列
43	GAGTGCATGAAGCTGGAATCGC
44	GAGTGCATGAAGCTGGAATCG
45	GAGTGCATGAAGCTGGAATC
46	GAGTGCATGAAGCTGGA
47	GAGTGCATGAAGCTGG
48	CGAGTGCATGAAGCTGGAATCGC
49	CGAGTGCATGAAGCTGGAATCG
50	CGAGTGCATGAAGCTGGAATC
51	CGAGTGCATGAAGCTGGAAT
52	CGAGTGCATGAAGCTGGAA
53	CGAGTGCATGAAGCTGGA
54	CGAGTGCATGAAGCTGG
55	CGAGTGCATGAAGCTG
56	TCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGC
57	TCGAGTGCATGAAGCTGGAATCG
58	TCGAGTGCATGAAGCTGGAATC
59	TCGAGTGCATGAAGCTGGAAT
60	TCGAGTGCATGAAGCTGGAA
61	TCGAGTGCATGAAGCTGGA
62	TCGAGTGCATGAAGCTGG
63	TCCCAGAAAACCGATC
64	TAATCCCAGAAAACCG
65	CTAATCCCAGAAAACCGA
66	GCTAATCCCAGAAAACCG
67	AGCTAATCCCAGAAAACCGA
68	AGCTAATCCCAGAAAACCG
69	AGCTAATCCCAGAAAACCG
70	GAGCTAATCCCAGAAAACCGA
71	GAGCTAATCCCAGAAAACCG
72	GAGCTAATCCCAGAAAACCG
73	GAGCTAATCCCAGAAAAC
74	TGGTCGGAACAGAGGGT
75	ATGGTCGGAACAGAGGGT
76	ATGGTCGGAACAGAGGG
77	AATGGTCGGAACAGAGGGT
78	AATGGTCGGAACAGAGGG
79	AATGGTCGGAACAGAGG
80	AATGGTCGGAACAGAG
81	CAATGGTCGGAACAGAGGGT
82	CAATGGTCGGAACAGAGGG
83	CAATGGTCGGAACAGAGG
84	CAATGGTCGGAACAGAG

【表4】

部分配列番号	5 塩基配列
85	CAATGGTCGGAACAGA
86	ACAATGGTCGGAACAGAGGGT
87	ACAATGGTCGGAACAGAGGG
88	ACAATGGTCGGAACAGAGG
89	ACAATGGTCGGAACAGAG
90	ACAATGGTCGGAACAGA
91	ACAATGGTCGGAACAG
92	TACAATGGTCGGAACAGAGGGT
93	TACAATGGTCGGAACAGAGGG
94	TACAATGGTCGGAACAGAGG
95	TACAATGGTCGGAACAGAG
96	TACAATGGTCGGAACAGA
97	TACAATGGTCGGAACAG
98	TACAATGGTCGGAACA
99	ATACAATGGTCGGAACAGAGGGT
100	ATACAATGGTCGGAACAGAGGG
101	ATACAATGGTCGGAACAGAGG
102	ATACAATGGTCGGAACAGAG
103	ATACAATGGTCGGAACAGA
104	ATACAATGGTCGGAACAG
105	ATACAATGGTCGGAACA
106	ATACAATGGTCGGAAC
107	AGGGCTTCACACGTCATACA
108	AGGGCTTCACACGTCATAC
109	AGGGCTTCACACGTCATA
110	AGGGCTTCACACGTCA
111	TAGGGCTTCACACGTCATACA
112	TAGGGCTTCACACGTCATAC
113	TAGGGCTTCACACGTCAT
114	TAGGGCTTCACACGTCA
115	TAGGGCTTCACACGTC
116	GTAGGGCTTCACACGTCATACA
117	GTAGGGCTTCACACGTCATAC
118	GTAGGGCTTCACACGTCATA
119	GTAGGGCTTCACACGTCAT
120	GTAGGGCTTCACACGTCA
121	GTAGGGCTTCACACGTC
122	GTAGGGCTTCACACGT
123	GGTAGGGCTTCACACGTCATACAA
124	GGTAGGGCTTCACACGTCATAC
125	GGTAGGGCTTCACACGTCATA
126	GGTAGGGCTTCACACGTCAT

【表5】

10

20

30

部分配列番号	6 塩基配列
127	GGTAGGGCTTCACACGTCA
128	GGTAGGGCTTCACACGTC
129	GGGTAGGGCTTCACACGTCATACA
130	GGGTAGGGCTTCACACGTCATAC
131	GGGTAGGGCTTCACACGTCATA
132	GGGTAGGGCTTCACACGTCAT
133	GGGTAGGGCTTCACACGTCA
134	GGGTAGGGCTTCACACGTC
135	TGGGTAGGGCTTCACACGTCATAC
136	TGGGTAGGGCTTCACACGTCAT
137	TGGGTAGGGCTTCACACGTCA
138	TGGGTAGGGCTTCACACGTC
139	TGGGTAGGGCTTCACACGT
140	TGGGTAGGGCTTCACAC
141	ATGGGTAGGGCTTCACACGTCATA
142	ATGGGTAGGGCTTCACACGTCA
143	ATGGGTAGGGCTTCACACGTC
144	ATGGGTAGGGCTTCACACGT
145	ATGGGTAGGGCTTCACACG
146	ATGGGTAGGGCTTCACA
147	TATGGGTAGGGCTTCACACGTCAT
148	TATGGGTAGGGCTTCACACGTCA
149	TATGGGTAGGGCTTCACACGTC
150	TATGGGTAGGGCTTCACACGT
151	TATGGGTAGGGCTTCACACG
152	TATGGGTAGGGCTTCACAC
153	TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCA
154	TTATGGGTAGGGCTTCACACGTC
155	TTATGGGTAGGGCTTCACACGT
156	TTATGGGTAGGGCTTCACACG
157	TTATGGGTAGGGCTTCACAC
158	TTATGGGTAGGGCTTCACA
159	CTTATGGGTAGGGCTTCACACGTC
160	CTTATGGGTAGGGCTTCACACGT
161	CTTATGGGTAGGGCTTCACACG
162	CTTATGGGTAGGGCTTCACAC
163	GAGAACCGGCGCACA
164	AGAGAACCGGCGCACAG
165	AGAGAACCGGCGCAC
166	AAGAGAACCGGCGCACAGG
167	AAGAGAACCGGCGCACAG
168	AAGAGAACCGGCGCACA

【表6】

部分配列番号	塩基配列
169	AAGAGAACCGGCGCAC
170	AAAGAGAACCGGCGCACAGG
171	AAAGAGAACCGGCGCACAG
172	AAAGAGAACCGGCGCAC
173	AAAGAGAACCGGCGCAC
174	GAAAGAGAACCGGCGCACAGG
175	GAAAGAGAACCGGCGCACAG
176	GAAAGAGAACCGGCGCAC
177	GAAAGAGAACCGGCGCAC
178	CGAAAGAGAACCGGCGCACAGG
179	CGAAAGAGAACCGGCGCACAG
180	CGAAAGAGAACCGGCGCAC
181	CGAAAGAGAACCGGCGCAC
182	TCGAAAGAGAACCGGCGCACAGG
183	TCGAAAGAGAACCGGCGCACAG
184	TCGAAAGAGAACCGGCGCAC
185	TCGAAAGAGAACCGGCGCAC
186	TCGAAAGAGAACCGGCGCA
187	TCGAAAGAGAACCGGCG
188	ACCGATGGCGAAGGCAG
189	TACCGATGGCGAAGGCAGC
190	TACCGATGGCGAAGGCA
191	ATACCGATGGCGAAGGCAGC
192	ATACCGATGGCGAAGGCAG
193	ATACCGATGGCGAAGGCA
194	ATACCGATGGCGAAGGC
195	AATACCGATGGCGAAGGCAGC
196	AATACCGATGGCGAAGGCAG
197	AATACCGATGGCGAAGGCA
198	GAATACCGATGGCGAAGGCAGC
199	GAATACCGATGGCGAAGGCAG
200	GGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
201	GGAATACCGATGGCGAAGGCAG
202	GGAATACCGATGGCGAAGGCA
203	AGGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
204	AGGAATACCGATGGCGAAGGCAG
205	AGGAATACCGATGGCGAAGGCA
206	AGGAATACCGATGGCGAAGGC
207	GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
208	GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAG
209	GAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
210	GAGGAATACCGATGGCGAAGGC

【表7】

部分配列番号	塩基配列
211	GGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAG
212	GGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
213	GGAGGAATACCGATGGCGAAGGC
214	GGAGGAATACCGATGGCGAAGG
215	TGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA
216	TGGAGGAATACCGATGGCGAAGGC
217	TGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
218	TGGAGGAATACCGATGGCGAAG
219	GTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGC
220	GTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
221	GTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
222	GTGGAGGAATACCGATGGCGAA
223	GTGGAGGAATACCGATGGCGA
224	TGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
225	TGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
226	TGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
227	TGTGGAGGAATACCGATGGCGA
228	TGTGGAGGAATACCGATGGCG
229	ATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
230	ATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
231	ATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
232	ATGTGGAGGAATACCGATGGCG
233	GATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
234	GATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
235	AGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
236	AGATGTGGAGGAATACCGATGGCG
237	AGATGTGGAGGAATACCGATGG
238	GAGATGTGGAGGAATACCGATG
239	AGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
240	AGAGATGTGGAGGAATACCGATG
241	AGAGATGTGGAGGAATACCGAT
242	TAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
243	TAGAGATGTGGAGGAATACCGA
244	GTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
245	GTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
246	GTAGAGATGTGGAGGAATACCG
247	CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
248	CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
249	CGTAGAGATGTGGAGGAATACCG
250	CGTAGAGATGTGGAGGAATACC
251	GCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
252	GCGTAGAGATGTGGAGGAATACCG

【表8】

部分配列番号	塩基配列
253	TGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCG
254	TGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC
255	TGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
256	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC
257	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATAC
258	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT
259	AATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
260	AATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
261	AAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
262	GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
263	TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
264	TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
265	TGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
266	GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
267	GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
268	GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
269	GTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
270	AGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
271	AGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
272	AGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
273	AGTGAAATGCGTAGAGATGTG
274	CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
275	CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
276	CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
277	CAGTGAAATGCGTAGAGATGTG
278	CAGTGAAATGCGTAGAGATGT
279	CAGTGAAATGCGTAGAGAT
280	TATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
281	TATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
282	GTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
283	GTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
284	GTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
285	AGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
286	AGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
287	AGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
288	AGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
289	AGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
290	GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
291	GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
292	GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
293	GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
294	GAGTATGGCAGAGGGGGGTAG

【表9】

10

20

30

部分配列番号	塩基配列
295	AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
296	AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
297	AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
298	AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
299	AGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
300	AGAGTATGGCAGAGG
301	TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
302	TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
303	TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
304	TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
305	TAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
306	TAGAGTATGGCAGAGGGGG
307	TAGAGTATGGCAGAGGG
308	TAGAGTATGGCAGAG
309	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
310	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
311	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
312	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
313	CTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
314	CTAGAGTATGGCAGAGGGGG
315	CTAGAGTATGGCAGAGGGG
316	CTAGAGTATGGCAGAGG
317	GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
318	GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
319	GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
320	GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
321	GCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
322	GCTAGAGTATGGCAGAGGG
323	GCTAGAGTATGGCAGAG
324	AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
325	AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
326	AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
327	AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
328	AGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
329	AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
330	AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
331	AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
332	AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
333	AAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
334	CAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
335	CAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
336	CAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG

【表10】

部分配列番号	塩基配列
337	GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
338	GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
339	GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
340	GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGG
341	GGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
342	GGTGACTGGCAAGCTAGAG
343	GGTGACTGGCAAGCT
344	TGGTGACTGGCAAGCTAGA
345	TGGTGACTGGCAAGCTA
346	TGCATTGGTGACTGGCA
347	ACTGCATTGGTGACTGGCA
348	AACTGCATTGGTGACTGGCA
349	AACTGCATTGGTGACTGGC
350	GAACTGCATTGGTGACTGGCA
351	GGAACTGCATTGGTGACTGGCA
352	GGGAACTGCATTGGTGACTGGCA
353	GGGAACTGCATTGGTGACTGGC
354	TGGGAACTGCATTGGTGACTGGCA
355	TGGGAACTGCATTGGTGACTGGC
356	TGGGAACTGCATTGGTGACTGG
357	CTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCA
358	CTGGGAACTGCATTGGTGACTGGC
359	CTGGGAACTGCATTGGTGACTGG
360	CTGGGAACTGCATTGGTGACTG
361	CCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGC
362	CCTGGGAACTGCATTGGTGACTGG
363	ACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGG
364	ACCTGGGAACTGCATTGGTGACTG
365	AACCTGGGAACTGCATTGGTGACTG
366	AACCTGGGAACTGCATTGGTGACT
367	AACCTGGGAACTGCATTGGTGA
368	CAACCTGGGAACTGCATTGGTGACT
369	CAACCTGGGAACTGCATTGGTGAC
370	CAACCTGGGAACTGCATTGGTG
371	TCAACCTGGGAACTGCATTGGTGAC
372	TCAACCTGGGAACTGCATTGGTGA
373	TCAACCTGGGAACTGCATTGGTG
374	TCAACCTGGGAACTGCATTGGT
375	CTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGA
376	CTCAACCTGGGAACTGCATTGGTG
377	CTCAACCTGGGAACTGCATTGG
378	GCTCAACCTGGGAACTGCA

【表11】

部分配列番号	塩基配列
379	GGCTCAACCTGGGAACTGCATTGG
380	GGCTCAACCTGGGAACTGCATT
381	GGCTCAACCTGGGAACTGCAT
382	GGCTCAACCTGGGAACTGC
383	GGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
384	CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
385	CCGGGCTCAACCTGGGAACTGC
386	GTTAAGACCGATGTG
387	TGTTAAGACCGATGTGA
388	TTGTTAAGACCGATGTGAA
389	TTGTTAAGACCGATGTG
390	TTTGTTAAGACCGATGTGA
391	CTCTAATACAGTCGGGG
392	TGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
393	TGGCTCTAATACAGTCGGGGG
394	TTGGCTCTAATACAGTCGGGGGAT
395	TTGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
396	TTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
397	TTGGCTCTAATACAGTCGGGG
398	CTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGAT
399	CTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
400	CTTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
401	CTTGGCTCTAATACAGTCGGGG
402	CCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
403	CCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
404	CCTTGGCTCTAATACAGTCGGGG
405	CCTTGGCTCTAATACAGTCGGG
406	TCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
407	TCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGG
408	ATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGG
409	ATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGG
410	AATCCTTGGCTCTAATACAGTCGGG
411	AATCCTTGGCTCTAATACAGTCGG
412	AAATCCTTGGCTCTAATACAGTCG
413	TTGGGCTCTCGCGCTAT
414	CTTCGGGCTCTCGCGCTATA
415	CTTCGGGCTCTCGCGCTA
416	CCTTCGGGCTCTCGCGCTAT
417	CCTTCGGGCTCTCGCGCT
418	ACCTTCGGGCTCTCGCGCTATA
419	GACCTTCGGGCTCTCGCGCTATA
420	GACCTTCGGGCTCTCGCGCTAT

【表12】

部分配列番号	塩基配列
421	GACCTTCGGGCTCTCGCGCT
422	GGACCTTCGGGCTCTCGCGCTAT
423	GGACCTTCGGGCTCTCGC
424	CGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGCT
425	GCGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGCT
426	AGCGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGC
427	AGCGGGGACCTTCGGGCTCTCGCG
428	AGCGGGGACCTTCGGGCTCTCGC
429	AGCGGGGACCTTCGGGCTCTCG
430	TCTACGGATGAAAGCGGGGACCT
431	CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATA
432	GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAG
433	TGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT
434	CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTG
435	CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGG
436	CCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT
437	CCTGGTGGCGAGTGGCGAACGG

失するか、または他の塩基もしくは塩基配列で置換もしくは付加されたものである請求項2～6のいずれか1項に記載の新規な核酸断片。

【請求項8】 請求項2～7のいずれか1項に記載の核酸断片であって、標識物または（および）固相担体と結合可能な部位が導入されている場合もある核酸断片よりなるプライマー。

【請求項9】 請求項2～7のいずれか1項に記載の核酸断片であって、標識物または（および）固相担体と結合可能な部位が導入されている場合もある核酸断片よりなるプローブ。

【請求項10】 2種の核酸断片の組み合わせからなるプライマーであって、少なくとも一方の核酸断片が請求項8に記載の核酸断片より選ばれたものであり、それぞれの核酸断片に標識物または（および）固相担体と結合可能な部位が導入されている場合もあるプライマー。

【請求項11】 変異配列が核酸断片の塩基配列の一部を欠失するか、または他の塩基もしくは塩基配列で置換もしくは付加されたものである請求項8および10のいずれか1項に記載のプライマー。

【請求項12】 標識物または固相担体と結合可能な部位が、核酸断片の5'末端側に導入されている請求項8～11のいずれか1項に記載のプライマーまたはプローブ。

【請求項13】 標識物または固相担体と結合可能な部位が、ビオチン残基、2, 4-ジニトロフェニル基、ジボキシゲニン残基のいずれかである請求項8～12のいずれか1項に記載のプライマーまたはプローブ。

【請求項14】 請求項2～7, 9, 12または13のいずれかに記載の核酸の塩基配列を有する核酸断片の少なくとも1種をプローブとして用いることを特徴とする *P. cepacia* KK01株の検出方法。

【請求項15】 請求項2～8, 10～13のいずれかに記載の核酸の塩基配列を有する核酸断片の少なくとも1種をプライマーとして用いることを特徴とする *P. cepacia* KK01株の検出方法。

【請求項16】 請求項8, 10～13または15のいずれかに記載のプライマーを用い、下記(1)～(4)の工程を実施することを特徴とする *P. cepacia* KK01株の検出方法。(1) *P. cepacia* KK01株の有無を検出したい試料を準備し、(2)必要に応じて、試料中の菌体の破碎処理を行い、(3)試料に上記プライマーを加えプライマーの伸張反応を行い、(4)工程(3)で得られた伸張反応物について検出操作を行う。

【請求項17】 請求項10に記載のプライマーを用いる請求項16記載の *P. cepacia* KK01株の検出方法。

【請求項18】 該プライマーの伸張反応がPCR (Polymerase Chain Reaction) で

ある請求項16、あるいは17のいずれか1項に記載の *P. cepacia* KK01株の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規核酸断片およびその用途に関する。詳しくは、*Pseudomonas cepacia* KK01株を検出するためのプライマーまたはプローブとして利用可能な核酸断片、およびそれを構成している塩基配列の部分配列、およびこれらを用いた *P. cepacia* KK01株の検出法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】*Pseudomonas* 属細菌は、グラム陰性の偏性好気性桿菌で、きわめて多彩な有機化合物を代謝する能力を持ち、特に各種芳香族化合物の分解能に優れていることが知られている。

【0003】近年、芳香族化合物、パラフィン、ナフテンなどの脂肪族炭化水素、あるいはトリクロロエチレンなどの有機塩素系化合物などによる環境汚染が問題となっており、すでに汚染されてしまった環境を浄化し、もとの状態に修復していく技術の確立が強く求められている。この環境修復技術としては種々の物理化学的な手法が行われているが、コスト、操作性、投下エネルギー量、処理範囲などに係る難点、汚染物質の単なる抽出、回収に留まり無害な化学物に変換するものではないなどの観点より、必ずしも実用的に満足できる技術であるとはいえない。

【0004】そこで、上記の物理化学的手法に対して、微生物を利用した処理が実用的な汚染環境の修復方法を提供できるものとして期待されている。ここで、汚染物質の多くは化学工業などで使用される合成物質であり、自然界に生息する微生物によっては普遍的には分解されないためその処理が容易でないものが多い。しかし、*Pseudomonas* 属細菌は先に述べたようにきわめて多彩な有機化合物を代謝する能力を持っており、土壤汚染問題を引き起こしている芳香族炭化水素や有機塩素系化合物などの難分解性化合物と言われるものでも分解することができる菌株が数多く分離されてきている。とりわけトリクロロエチレン分解菌の開発は盛んに進められており、その分解活性を向上させたり、あるいはトリクロロエチレン分解酵素の誘導物質を不要化したりした遺伝子組み換え菌の土壤への散布なども検討されはじめてきている。

【0005】ここで、発明者らは *P. cepacia* KK01株（寄託番号：P-12869号）がトリクロロエチレンを分解することを明らかにしており、このような *Pseudomonas* 属細菌を利用した環境浄化技術を普及させ、さらにこの技術を実用的かつ社会的に有効な技術として定着させていくために、分解能力などにすぐれた菌の開発とともに、それらを導入した土壤に

おける菌の活動、増殖、伝搬、生残、つまりは土壤中での菌の優占度、生育状況などを十分に把握していくことを研究している。これらの課題を解決していくためには、目的とする菌を選択的に検出することができる手法の確立がまず必要不可欠である。

【0006】*Pseudomonas* 属細菌の検出方法としては種々の分離培養法が知られており、一般的には特別な培地による選択培養を行うことが多い。この方法は簡便であるため広く用いられるが、目的とする菌のみが必ずしも選択的に培養されるとは限らない。たとえば、フェノールを分解する菌である *P. cepacia* KK01 株の場合には、カテコールのカテコール2, 3 オキシゲナーゼによる分解産物である 2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒドの黄色の着色を簡便な指標とすることができる。しかしながら、カテコールをメタ開裂により代謝できる他の菌が存在する可能性もあり、厳密には黄色の着色のみをその指標とすることはできず、更に詳細な形態学的、あるいは生化学的な性状をも検査する必要がある。

【0007】しかしここで必要となる形態学的、あるいは生化学的な性状から目的とする菌を検出するには数多くの熟練と経験を要し、しかもその手法は煩雑であり時間がかかるなど、実用面では種々の問題があった。

【0008】また、目的とする菌に特異的な抗体を用意し放射性同位元素または蛍光色素でラベルし検出に用いる方法も知られているが、この方法はまず抗体を得るのに非常に手間がかかる点と、更に抗体の特異性がロットにより大きくばらつく点が大きな難点であった。

【0009】これらの方法に代るものとして、生物種に特異的な核酸の塩基配列に着目し、それに相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーあるいはプローブを利用することによりその生物種を検出する方法が発表されている。特に、リボゾーマルRNA (rRNA) は生物において必須の細胞構成成分であり、その構造は生物の進化の過程において比較的よく保存されている。rRNAの中でも16S rRNAについては比較的よく研究が行われており、多くの生物種についてその塩基配列が同定されている。

【0010】16S rRNAには種々の生物で共通に保存されている領域と、生物種により配列の異なる可変領域のあることが知られており、この可変領域に対応するDNAプライマーあるいはプローブを利用した菌の検出、同定法が近年開発されてきた。たとえば、rRNAは細胞中に10⁴個以上存在し、ハイブリダイゼーション法のターゲットとしては感度の面からも非常に有利に利用できるものであるが、ここでは、目的とする菌を検出するためのプローブまたはプライマーをいかに選択するかの点こそが最も重要かつ困難な課題となっており、この方法を利用するためには目的とする細菌の16S rRNA、あるいはその遺伝子の塩基配列を正しく

知る必要がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】前述のように、特定の微生物を利用して土壤中の汚染物質の浄化処理を行う場合、処理の条件や微生物の生育条件を最適にするためには、まずその微生物の土壤中での優占度や生育状況を知る必要がある。そのためには微生物を特異的に検出、計測できる方法が必要であるが、いままでの *Pseudomonas* 属細菌の検出はフェノールを唯一の炭素源とする選択培地による培養や、抗体法などによるもので、その特異性、感度、簡便さ、検出に要する時間などの点で問題が多く、土壤中での菌の挙動をリアルタイムでモニタリングすることは不可能であった。

【0012】本発明は、上記従来技術の課題に鑑みなされたものであり、その目的は迅速、簡易かつ特異的に、しかも感度よく *P. cepacia* KK01 株を検出、計数する方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、後記の配列番号1で表される *P. cepacia* KK01 株の16S rRNA 遺伝子を提供するものである。本発明はまた、上記遺伝子配列で示される核酸、ならびに、その相補的な塩基配列を有する核酸、および、これらの変異配列で示される核酸から選ばれる核酸断片に関するものである。

【0014】本発明は、また、上記のいずれかの核酸中の部分配列であってプライマーまたはプローブとして利用可能な核酸からなる核酸断片に関する。具体的には、プライマーとして利用可能な核酸が10～50塩基の長さであり、プローブとして利用可能な核酸が10塩基から上限は各核酸の全塩基数以下の長さの核酸断片である。

【0015】また、本発明は上記核酸断片を利用したプライマーまたはプローブに関する。すなわち本発明によるプライマーまたはプローブは、上記したような核酸断片であって、標識物または(および)固相担体と結合可能な部位が導入されている場合もある核酸断片からなるプライマーまたはプローブである。

【0016】本発明は、また、上記のプライマー、あるいはプローブを利用した *P. cepacia* KK01 株の検出方法に関する。すなわち、プライマーを利用した本発明による *P. cepacia* KK01 株の検出方法は、上記したような本発明によるプライマー、好ましくは2種の組み合わせからなるプライマーを用いて、下記(1)～(4)の工程を実施することを特徴とするものである。

(1) *P. cepacia* KK01 株の有無を検出したい試料を準備し、(2)必要に応じて、試料中の菌体の破砕処理を行い、(3)試料に上記プライマーを加えプライマーの伸張反応を行い、(4)工程(3)で得ら

17

れた伸張反応物について検出操作を行う。

【0017】また、プローブを利用した本発明による *P. cepacia* KK01株の検出方法は、前記したようなプローブの少なくとも1種を用いることを特徴とするものである。

【0018】以下、本発明を詳細に説明するが、ここでいう *P. cepacia* KK01株は、この発明の目的に適う限りにおいて遺伝子工学の常識に従って同等の作用を奏するその突然変異株も包含するものである。

【0019】*P. cepacia* KK01株16S rRNA遺伝子のクローニング、全塩基配列の決定 10
既知の種々のグラム陰性細菌のrRNA塩基配列を比較し、共通配列領域の推定を行った。次に、この領域よりプライマーDNAを合成し、PCR法により *P. cepacia* KK01株DNA中の16S rRNA遺伝子領域内の約1100塩基の断片を増幅し、プラスミドpUC119のHincII切断部位にクローニングした。得られた遺伝子の塩基配列を決定し、既知の16S rRNA塩基配列との比較により、この断片が16S rRNA遺伝子であることを確認した。

【0020】この遺伝子断片を用いて、完全長のPCRを経由しない16S rRNA遺伝子のクローニングを行った。まず、*P. cepacia* KK01株DNAをSau3AIで切断し、λファージベクターDASHIIのBamHI部位に挿入し、ライブラリーを調製した。これを上記16S rRNA遺伝子部分断片をプローブとしたアークハイブリダイゼーション法によりスクリーニングし、完全長の16S rRNA遺伝子を含むクローンを選択した。

【0021】塩基配列の決定は欠失法と適当な制限酵素切断部位を利用したサブクローニングにより行った。欠失は、プラスミドpUC119のHincII切断部位に完全長の16S rRNA遺伝子をリクローニングの後、ExonucleaseIIIとMung Bean Nucleaseにより段階的に導入した。これらの段階欠失クローンおよび制限酵素を利用したサブクローンを用いて、ダイデオキシ法により塩基配列の決定を行った。

【0022】*P. cepacia* VKK01株16S rRNA遺伝子の特異領域の決定

上記のようにして決定した塩基配列を、既知の他種細菌16S rRNA遺伝子塩基配列と比較し、特異領域を決定した。この場合EMBL核酸配列データライブラリなどを利用しパーソナル・コンピュータを利用して解析を行った。

【0023】決定した特異領域は、新規な塩基配列であり本発明の目的に利用可能性を備えているから特許請求の範囲請求項3に列記して特許請求するものである。

【0024】核酸断片

本発明による核酸断片は、配列番号1で示す核酸、なら 50

18

びに、その相補的な塩基配列を有する核酸、および、これらの変異配列で示される核酸から選ばれる核酸断片、また、上記のいずれかの核酸中の部分配列であってプライマーまたはプローブとして利用可能な核酸からなるものであることは前記したとおりである。

【0025】これらの核酸断片は、特にプローブとして、また、部分塩基配列はプライマーまたはプローブとして使用することができる。プライマーまたはプローブとして利用可能な核酸は、*P. cepacia* KK01株を検出するためのプライマー、あるいはプローブとして機能するものであればよい。ここで、部分塩基配列を用いる場合には、*P. cepacia* KK01株に特異的で、他の細菌、たとえば *P. putida*、*P. aeruginosa* などの他種 *Pseudomonas* 属細菌、土壌よりよく分離される、*Alcaligenes* 属細菌、*Xanthomonas* 属細菌、*Agrobacterium* 属細菌、*Enterobacteriaceae* 属細菌などに相同性の少ない部分を選択することが好ましい。部分塩基配列は具体的には、プライマーの場合、10～50塩基の長さであり、プローブの場合は10塩基の長さから各核酸の全塩基数以下の長さのものである。

【0026】これらの核酸断片あるいはその部分塩基配列は、合目的な任意の方法により調製することができ、たとえば後述実施例に記載の方法に従い、配列全部または一部を化学合成してもよい。あるいは、*P. cepacia* KK01株の遺伝子から制限酵素などを利用して直接切り出すことも可能であり、また、それらの遺伝子を *E. coli* などのプラスミドにクローニングし、菌の増殖の後にプラスミドを回収し、切り出して利用することも可能である。

【0027】本発明における上記核酸断片における変異としては、たとえば一部の塩基もしくは塩基配列の欠失、置換、付加などがあげられる。ここで核酸断片をプライマーとして利用する場合は、プライマーの伸張反応に大きな影響を与えられとされる3'末端付近は変異のないようにするか、あるいはあっても最小限にとどめることが好ましく、より好適には5'末端付近で変異があるようにすることが本発明の目的に適う。

【0028】ここで好適に利用できる核酸断片の塩基配列としては、勿論前記の特異領域にそのすべてないしは大部分が由来し僅かの隣接部分を有するもので目的遂行に便利程度の塩基長のものとして発明者は特許請求の範囲の請求項6で示しているものを提出する。なお理解の便宜の為に次にこれらの塩基配列を配列表1に示した塩基番号を併記し再掲しておく。

【0029】

【表13】

19		20	
1	1430 - 1445 : AACCGCAAGGAGGACG	43	1307 - 1328 : GAGTGCATGAAGCTGGAATCGC
2	1429 - 1445 : TAACCGCAAGGAGGACG	44	1307 - 1327 : GAGTGCATGAAGCTGGAATCG
3	1429 - 1444 : TAACCGCAAGGAGGAC	45	1307 - 1326 : GAGTGCATGAAGCTGGAATC
4	1428 - 1445 : CTAACCGCAAGGAGGACG	46	1307 - 1323 : GAGTGCATGAAGCTGGA
5	1428 - 1444 : CTAACCGCAAGGAGGAC	47	1307 - 1322 : GAGTGCATGAAGCTGG
6	1428 - 1443 : CTAACCGCAAGGAGGA	48	1306 - 1328 : CGAGTGCATGAAGCTGGAATCGC
7	1427 - 1445 : TCTAACCGCAAGGAGGACG	49	1306 - 1327 : CGAGTGCATGAAGCTGGAATCG
8	1427 - 1444 : TCTAACCGCAAGGAGGAC	50	1306 - 1326 : CGAGTGCATGAAGCTGGAATC
9	1427 - 1443 : TCTAACCGCAAGGAGGA	51	1306 - 1325 : CGAGTGCATGAAGCTGGAAT
10	1427 - 1442 : TCTAACCGCAAGGAGG	52	1306 - 1324 : CGAGTGCATGAAGCTGGAA
11	1426 - 1445 : GTCTAACCGCAAGGAGGACG	53	1306 - 1323 : CGAGTGCATGAAGCTGGA
12	1426 - 1444 : GTCTAACCGCAAGGAGGAC	54	1306 - 1322 : CGAGTGCATGAAGCTGG
13	1426 - 1443 : GTCTAACCGCAAGGAGGA	55	1306 - 1321 : CGAGTGCATGAAGCTG
14	1426 - 1442 : GTCTAACCGCAAGGAGG	56	1305 - 1328 : TCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGC
15	1426 - 1441 : GTCTAACCGCAAGGAG	57	1305 - 1327 : TCGAGTGCATGAAGCTGGAATCG
16	1425 - 1445 : AGTCTAACCGCAAGGAGGACG	58	1305 - 1326 : TCGAGTGCATGAAGCTGGAATC
17	1425 - 1444 : AGTCTAACCGCAAGGAGGAC	59	1305 - 1325 : TCGAGTGCATGAAGCTGGAAT
18	1425 - 1443 : AGTCTAACCGCAAGGAGGA	60	1305 - 1324 : TCGAGTGCATGAAGCTGGAA
19	1425 - 1442 : AGTCTAACCGCAAGGAGG	61	1305 - 1323 : TCGAGTGCATGAAGCTGGA
20	1425 - 1441 : AGTCTAACCGCAAGGAG	62	1305 - 1322 : TCGAGTGCATGAAGCTGG
21	1425 - 1440 : AGTCTAACCGCAAGGA	63	1265 - 1280 : TCCAGAAAACCGATC
22	1318 - 1338 : GCTGGAATCGCTAGTAATCGC	64	1262 - 1277 : TAATCCAGAAAACCG
23	1318 - 1337 : GCTGGAATCGCTAGTAATCG	65	1261 - 1278 : CTAATCCAGAAAACCGA
24	1313 - 1328 : ATGAAGCTGGAATCGC	66	1260 - 1277 : GCTAATCCAGAAAACCG
25	1312 - 1328 : CATGAAGCTGGAATCGC	67	1259 - 1278 : AGCTAATCCAGAAAACCGA
26	1312 - 1327 : CATGAAGCTGGAATCG	68	1259 - 1277 : AGCTAATCCAGAAAACCG
27	1311 - 1328 : GCATGAAGCTGGAATCGC	69	1259 - 1276 : AGCTAATCCAGAAAACC
28	1311 - 1327 : GCATGAAGCTGGAATCG	70	1258 - 1278 : GAGCTAATCCAGAAAACCGA
29	1311 - 1326 : GCATGAAGCTGGAATC	71	1258 - 1277 : GAGCTAATCCAGAAAACCG
30	1310 - 1328 : TGCATGAAGCTGGAATCGC	72	1258 - 1276 : GAGCTAATCCAGAAAACC
31	1310 - 1327 : TGCATGAAGCTGGAATCG	73	1258 - 1275 : GAGCTAATCCAGAAAAC
32	1310 - 1326 : TGCATGAAGCTGGAATC	74	1224 - 1240 : TGGTCGGAACAGAGGGT
33	1310 - 1325 : TGCATGAAGCTGGAAT	75	1223 - 1240 : ATGGTCGGAACAGAGGGT
34	1309 - 1328 : GTGCATGAAGCTGGAATCGC	76	1223 - 1239 : ATGGTCGGAACAGAGGG
35	1309 - 1327 : GTGCATGAAGCTGGAATCG	77	1222 - 1240 : AATGGTCGGAACAGAGGGT
36	1309 - 1326 : GTGCATGAAGCTGGAATC	78	1222 - 1239 : AATGGTCGGAACAGAGGG
37	1309 - 1324 : GTGCATGAAGCTGGAA	79	1222 - 1238 : AATGGTCGGAACAGAGG
38	1308 - 1328 : AGTGCATGAAGCTGGAATCGC	80	1222 - 1237 : AATGGTCGGAACAGAG
39	1308 - 1327 : AGTGCATGAAGCTGGAATCG	81	1221 - 1240 : CAATGGTCGGAACAGAGGGT
40	1308 - 1326 : AGTGCATGAAGCTGGAATC	82	1221 - 1239 : CAATGGTCGGAACAGAGGG
41	1308 - 1325 : AGTGCATGAAGCTGGAAT	83	1221 - 1238 : CAATGGTCGGAACAGAGG
42	1308 - 1323 : AGTGCATGAAGCTGGA	84	1221 - 1237 : CAATGGTCGGAACAGAG

【0030】

【表14】

【0031】

【表15】

21

85 1221 - 1236 : CAATGGTCGGAACAGA
 86 1220 - 1240 : ACAATGGTCGGAACAGAGGGT
 87 1220 - 1239 : ACAATGGTCGGAACAGAGGG
 88 1220 - 1238 : ACAATGGTCGGAACAGAGG
 89 1220 - 1237 : ACAATGGTCGGAACAGAG
 90 1220 - 1236 : ACAATGGTCGGAACAGA
 91 1220 - 1235 : ACAATGGTCGGAACAG
 92 1219 - 1240 : TACAATGGTCGGAACAGAGGGT
 93 1219 - 1239 : TACAATGGTCGGAACAGAGGG
 94 1219 - 1238 : TACAATGGTCGGAACAGAGG
 95 1219 - 1237 : TACAATGGTCGGAACAGAG
 96 1219 - 1236 : TACAATGGTCGGAACAGA
 97 1219 - 1235 : TACAATGGTCGGAACAG
 98 1219 - 1234 : TACAATGGTCGGAACA
 99 1218 - 1240 : ATACAATGGTCGGAACAGAGGGT
 100 1218 - 1239 : ATACAATGGTCGGAACAGAGGG
 101 1218 - 1238 : ATACAATGGTCGGAACAGAGG
 102 1218 - 1237 : ATACAATGGTCGGAACAGAG
 103 1218 - 1236 : ATACAATGGTCGGAACAGA
 104 1218 - 1235 : ATACAATGGTCGGAACAG
 105 1218 - 1234 : ATACAATGGTCGGAACA
 106 1218 - 1233 : ATACAATGGTCGGAAC
 107 1203 - 1222 : AGGGCTTCACACGTCATACA
 108 1203 - 1221 : AGGGCTTCACACGTCATAC
 109 1203 - 1220 : AGGGCTTCACACGTCATA
 110 1203 - 1218 : AGGGCTTCACACGTCAC
 111 1202 - 1222 : TAGGGCTTCACACGTCATACA
 112 1202 - 1221 : TAGGGCTTCACACGTCATAC
 113 1202 - 1219 : TAGGGCTTCACACGTCAT
 114 1202 - 1218 : TAGGGCTTCACACGTCAC
 115 1202 - 1217 : TAGGGCTTCACACGTC
 116 1201 - 1222 : GTAGGGCTTCACACGTCATACA
 117 1201 - 1221 : GTAGGGCTTCACACGTCATAC
 118 1201 - 1220 : GTAGGGCTTCACACGTCATA
 119 1201 - 1219 : GTAGGGCTTCACACGTCAT
 120 1201 - 1218 : GTAGGGCTTCACACGTCAC
 121 1201 - 1217 : GTAGGGCTTCACACGTC
 122 1201 - 1216 : GTAGGGCTTCACACGT
 123 1200 - 1223 : GGTAGGGCTTCACACGTCATACAA
 124 1200 - 1221 : GGTAGGGCTTCACACGTCATAC
 125 1200 - 1220 : GGTAGGGCTTCACACGTCATA
 126 1200 - 1219 : GGTAGGGCTTCACACGTCAT

【0032】

【表16】

22

127 1200 - 1218 : GGTAGGGCTTCACACGTCA
 128 1200 - 1217 : GGTAGGGCTTCACACGTC
 129 1199 - 1222 : GGTAGGGCTTCACACGTCATACA
 130 1199 - 1221 : GGTAGGGCTTCACACGTCATAC
 131 1199 - 1220 : GGTAGGGCTTCACACGTCATA
 132 1199 - 1219 : GGTAGGGCTTCACACGTCAT
 133 1199 - 1218 : GGTAGGGCTTCACACGTCA
 134 1199 - 1217 : GGTAGGGCTTCACACGTC
 135 1198 - 1221 : TGGTAGGGCTTCACACGTCATAC
 136 1198 - 1219 : TGGTAGGGCTTCACACGTCAT
 137 1198 - 1218 : TGGTAGGGCTTCACACGTCAC
 138 1198 - 1217 : TGGTAGGGCTTCACACGTC
 139 1198 - 1216 : TGGTAGGGCTTCACACGT
 140 1198 - 1214 : TGGTAGGGCTTCACAC
 141 1197 - 1220 : ATGGGTAGGGCTTCACACGTCATA
 142 1197 - 1218 : ATGGGTAGGGCTTCACACGTCAC
 143 1197 - 1217 : ATGGGTAGGGCTTCACACGTC
 144 1197 - 1216 : ATGGGTAGGGCTTCACACGT
 145 1197 - 1215 : ATGGGTAGGGCTTCACACG
 146 1197 - 1213 : ATGGGTAGGGCTTCACAC
 147 1196 - 1219 : TATGGGTAGGGCTTCACACGTCAT
 148 1196 - 1218 : TATGGGTAGGGCTTCACACGTCAC
 149 1196 - 1217 : TATGGGTAGGGCTTCACACGTC
 150 1196 - 1216 : TATGGGTAGGGCTTCACACGT
 151 1196 - 1215 : TATGGGTAGGGCTTCACACG
 152 1196 - 1214 : TATGGGTAGGGCTTCACAC
 153 1195 - 1218 : TTATGGGTAGGGCTTCACACGTCAC
 154 1195 - 1217 : TTATGGGTAGGGCTTCACACGTC
 155 1195 - 1216 : TTATGGGTAGGGCTTCACACGT
 156 1195 - 1215 : TTATGGGTAGGGCTTCACACG
 157 1195 - 1214 : TTATGGGTAGGGCTTCACAC
 158 1195 - 1213 : TTATGGGTAGGGCTTCACAC
 159 1194 - 1217 : CTTATGGGTAGGGCTTCACACGTC
 160 1194 - 1216 : CTTATGGGTAGGGCTTCACACGT
 161 1194 - 1215 : CTTATGGGTAGGGCTTCACACG
 162 1194 - 1214 : CTTATGGGTAGGGCTTCACAC
 163 1022 - 1036 : GAGAACCGGCGCACA
 164 1021 - 1037 : AGAGAACCGGCGCACAG
 165 1021 - 1035 : AGAGAACCGGCGCAC
 166 1020 - 1038 : AAGAGAACCGGCGCACAGG
 167 1020 - 1037 : AAGAGAACCGGCGCACAG
 168 1020 - 1036 : AAGAGAACCGGCGCACA

【0033】

【表17】

23

169 1020 - 1035 : AAGAGAACCGGCGCAC
 170 1019 - 1038 : AAAGAGAACCGGCGCACAGG
 171 1019 - 1037 : AAAGAGAACCGGCGCACAG
 172 1019 - 1036 : AAAGAGAACCGGCGCACA
 173 1019 - 1035 : AAAGAGAACCGGCGCAC
 174 1018 - 1038 : GAAAGAGAACCGGCGCACAGG
 175 1018 - 1037 : GAAAGAGAACCGGCGCACAG
 176 1018 - 1036 : GAAAGAGAACCGGCGCACA
 177 1018 - 1035 : GAAAGAGAACCGGCGCAC
 178 1017 - 1038 : CGAAAGAGAACCGGCGCACAGG
 179 1017 - 1037 : CGAAAGAGAACCGGCGCACAG
 180 1017 - 1036 : CGAAAGAGAACCGGCGCACA
 181 1017 - 1035 : CGAAAGAGAACCGGCGCAC
 182 1016 - 1038 : TCGAAAGAGAACCGGCGCACAGG
 183 1016 - 1037 : TCGAAAGAGAACCGGCGCACAG
 184 1016 - 1036 : TCGAAAGAGAACCGGCGCACA
 185 1016 - 1035 : TCGAAAGAGAACCGGCGCAC
 186 1016 - 1034 : TCGAAAGAGAACCGGCGCA
 187 1016 - 1032 : TCGAAAGAGAACCGGCG
 188 707 - 723 : ACCGATGGCGAAGGCAG
 189 706 - 724 : TACCGATGGCGAAGGCAGC
 190 706 - 722 : TACCGATGGCGAAGGCCA
 191 705 - 724 : ATACCGATGGCGAAGGCAGC
 192 705 - 723 : ATACCGATGGCGAAGGCAG
 193 705 - 722 : ATACCGATGGCGAAGGCCA
 194 705 - 721 : ATACCGATGGCGAAGGCC
 195 704 - 724 : AATACCGATGGCGAAGGCAGC
 196 704 - 723 : AATACCGATGGCGAAGGCAG
 197 704 - 722 : AATACCGATGGCGAAGGCCA
 198 703 - 724 : GAATACCGATGGCGAAGGCAGC
 199 703 - 723 : GAATACCGATGGCGAAGGCAG
 200 702 - 724 : GGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
 201 702 - 723 : GGAATACCGATGGCGAAGGCAG
 202 702 - 722 : GGAATACCGATGGCGAAGGCCA
 203 701 - 724 : AGGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
 204 701 - 723 : AGGAATACCGATGGCGAAGGCAG
 205 701 - 722 : AGGAATACCGATGGCGAAGGCCA
 206 701 - 721 : AGGAATACCGATGGCGAAGGCC
 207 700 - 724 : GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGC
 208 700 - 723 : GAGGAATACCGATGGCGAAGGCAG
 209 700 - 722 : GAGGAATACCGATGGCGAAGGCCA
 210 700 - 721 : GAGGAATACCGATGGCGAAGGCC

【0034】

【表18】

24

211 699 - 723 : GGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAG
 212 699 - 722 : GGAGGAATACCGATGGCGAAGGCCA
 213 699 - 721 : GGAGGAATACCGATGGCGAAGGCC
 214 699 - 720 : GGAGGAATACCGATGGCGAAGG
 215 698 - 722 : TGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCCA
 216 698 - 721 : TGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCC
 217 698 - 720 : TGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
 218 698 - 719 : TGGAGGAATACCGATGGCGAAG
 219 697 - 721 : GTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCC
 220 697 - 720 : GTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
 221 697 - 719 : GTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
 222 697 - 718 : GTGGAGGAATACCGATGGCGGAA
 10 223 697 - 717 : GTGGAGGAATACCGATGGCGA
 224 696 - 720 : TGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGG
 225 696 - 719 : TGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
 226 696 - 718 : TGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
 227 696 - 717 : TGTGGAGGAATACCGATGGCGA
 228 696 - 716 : TGTGGAGGAATACCGATGGCG
 229 695 - 719 : ATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAG
 230 695 - 718 : ATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
 231 695 - 717 : ATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
 232 695 - 716 : ATGTGGAGGAATACCGATGGCG
 233 694 - 718 : GATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA
 234 694 - 717 : GATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
 235 693 - 717 : AGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
 20 236 693 - 716 : AGATGTGGAGGAATACCGATGGCG
 237 693 - 714 : AGATGTGGAGGAATACCGATGG
 238 692 - 713 : GAGATGTGGAGGAATACCGATG
 239 691 - 714 : AGAGATGTGGAGGAATACCGATGG
 240 691 - 713 : AGAGATGTGGAGGAATACCGATG
 241 691 - 712 : AGAGATGTGGAGGAATACCGAT
 242 690 - 713 : TAGAGATGTGGAGGAATACCGATG
 243 690 - 711 : TAGAGATGTGGAGGAATACCGA
 244 689 - 712 : GTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
 245 689 - 711 : GTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
 246 689 - 710 : GTAGAGATGTGGAGGAATACCG
 247 688 - 712 : CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAT
 248 688 - 711 : CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
 30 249 688 - 710 : CGTAGAGATGTGGAGGAATACCG
 250 688 - 709 : CGTAGAGATGTGGAGGAATACCG
 251 687 - 711 : GCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGA
 252 687 - 710 : GCGTAGAGATGTGGAGGAATACCG

【0035】

【表19】

25
 253 686 - 710 : TGCCTAGAGATGTGGAGGAATACCG
 254 686 - 709 : TGCCTAGAGATGTGGAGGAATACC
 255 686 - 707 : TGCCTAGAGATGTGGAGGAATA
 256 685 - 709 : ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC
 257 685 - 708 : ATGCGTAGAGATGTGGAGGAATAC
 258 685 - 706 : ATGCGTAGAGATGTGGAGGAAT
 259 684 - 707 : AATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
 260 684 - 705 : AATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
 261 683 - 704 : AAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
 262 682 - 705 : GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
 263 681 - 705 : TGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
 264 681 - 704 : TGAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
 265 681 - 702 : TGAATGCGTAGAGATGTGGAG
 266 680 - 704 : GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
 267 680 - 703 : GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
 268 680 - 702 : GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
 269 680 - 701 : GTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
 270 679 - 703 : AGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
 271 679 - 702 : AGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
 272 679 - 700 : AGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
 273 679 - 699 : AGTGAAATGCGTAGAGATGTG
 274 678 - 702 : CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
 275 678 - 701 : CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
 276 678 - 700 : CAGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
 277 678 - 699 : CAGTGAAATGCGTAGAGATGTG
 278 678 - 698 : CAGTGAAATGCGTAGAGATGT
 279 678 - 696 : CAGTGAAATGCGTAGAGAT
 280 646 - 667 : TATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
 281 646 - 666 : TATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
 282 645 - 667 : GTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
 283 645 - 666 : GTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
 284 645 - 665 : GTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
 285 644 - 667 : AGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
 286 644 - 666 : AGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
 287 644 - 665 : AGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
 288 644 - 664 : AGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
 289 644 - 662 : AGTATGGCAGAGGGGGGTAA
 290 643 - 667 : GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATT
 291 643 - 666 : GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
 292 643 - 665 : GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
 293 643 - 664 : GAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
 294 643 - 663 : GAGTATGGCAGAGGGGGGTAG

【0036】

【表20】

10

20

30

26

295 642 - 666 : AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
 296 642 - 665 : AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
 297 642 - 664 : AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
 298 642 - 663 : AGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
 299 642 - 662 : AGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
 300 642 - 656 : AGAGTATGGCAGAGG
 301 641 - 665 : TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAA
 302 641 - 664 : TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
 303 641 - 663 : TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
 304 641 - 662 : TAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
 305 641 - 661 : TAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
 306 641 - 659 : TAGAGTATGGCAGAGGGG
 307 641 - 657 : TAGAGTATGGCAGAGGG
 308 641 - 655 : TAGAGTATGGCAGAG
 309 640 - 664 : CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGA
 310 640 - 663 : CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
 311 640 - 662 : CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
 312 640 - 661 : CTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
 313 640 - 660 : CTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 314 640 - 659 : CTAGAGTATGGCAGAGGGG
 315 640 - 658 : CTAGAGTATGGCAGAGGG
 316 640 - 656 : CTAGAGTATGGCAGAGG
 317 639 - 663 : GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG
 318 639 - 662 : GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
 319 639 - 661 : GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
 320 639 - 660 : GCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
 321 639 - 659 : GCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 322 639 - 657 : GCTAGAGTATGGCAGAGGG
 323 639 - 655 : GCTAGAGTATGGCAGAG
 324 638 - 662 : AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTA
 325 638 - 661 : AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGT
 326 638 - 660 : AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
 327 638 - 659 : AGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 328 638 - 658 : AGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
 329 637 - 661 : AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGT
 330 637 - 660 : AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGG
 331 637 - 659 : AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 332 637 - 658 : AAGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
 333 637 - 657 : AAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
 334 636 - 660 : CAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 335 636 - 659 : CAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 336 636 - 657 : CAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG

【0037】

【表21】

27

337 635 - 659 : GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGG
 338 635 - 658 : GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
 339 635 - 657 : GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
 340 635 - 656 : GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGG
 341 634 - 657 : GGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGG
 342 627 - 645 : GGTGACTGGCAAGCTAGAG
 343 627 - 641 : GGTGACTGGCAAGCT
 344 626 - 644 : TGGTGAAGCTGGCAAGCTAGAG
 345 626 - 642 : TGGTGAAGCTGGCAAGCTA
 346 621 - 637 : TGCATTGGTGAAGCTGGCA
 347 619 - 637 : ACTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 348 618 - 637 : AACTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 349 618 - 636 : AACTGCAATTGGTGAAGCTGGC
 350 617 - 637 : GAACTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 351 616 - 637 : GGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 352 615 - 637 : GGGAACTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 353 615 - 636 : GGGAACTGCAATTGGTGAAGCTGGC
 354 614 - 637 : TGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 355 614 - 636 : TGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGGC
 356 614 - 635 : TGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGG
 357 613 - 637 : CTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGGCA
 358 613 - 636 : CTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGGC
 359 613 - 635 : CTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGG
 360 613 - 634 : CTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTG
 361 612 - 636 : CCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGGC
 362 612 - 635 : CCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGG
 363 611 - 635 : ACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTGG
 364 611 - 634 : ACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTG
 365 610 - 634 : AACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCTG
 366 610 - 633 : AACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 367 610 - 631 : AACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 368 609 - 633 : CAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 369 609 - 632 : CAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 370 609 - 630 : CAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 371 608 - 632 : TCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 372 608 - 631 : TCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 373 608 - 630 : TCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 374 608 - 629 : TCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 375 607 - 631 : CTCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 376 607 - 630 : CTCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 377 607 - 628 : CTCAACCTGGGAAGCTGCAATTGGTGAAGCT
 378 606 - 624 : GCTCAACCTGGGAAGCTGCA

28

* 379 605 - 628 : GGCTCAACCTGGGAAGCTGCATTGG
 380 605 - 626 : GGCTCAACCTGGGAAGCTGCATT
 381 605 - 625 : GGCTCAACCTGGGAAGCTGCAT
 382 605 - 623 : GGCTCAACCTGGGAAGCTGC
 383 604 - 625 : GGGCTCAACCTGGGAAGCTGCAT
 384 602 - 625 : CCGGGCTCAACCTGGGAAGCTGCAT
 385 602 - 623 : CCGGGCTCAACCTGGGAAGCTGC
 386 581 - 595 : GTTAAGACCGATGTG
 387 580 - 596 : TGTTAAGACCGATGTGA
 388 579 - 597 : TTGTTAAGACCGATGTGAA
 389 579 - 595 : TTGTTAAGACCGATGTG
 390 578 - 596 : TTTGTTAAGACCGATGTGA
 391 450 - 466 : CTCTAATACAGTCGGGG
 392 447 - 468 : TGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
 393 447 - 467 : TGGCTCTAATACAGTCGGGGG
 394 446 - 469 : TTGGCTCTAATACAGTCGGGGGAT
 395 446 - 468 : TTGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
 396 446 - 467 : TTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
 397 446 - 466 : TTGGCTCTAATACAGTCGGGG
 398 445 - 469 : CTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGAT
 399 445 - 468 : CTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
 400 445 - 467 : CTTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
 401 445 - 466 : CTTGGCTCTAATACAGTCGGGG
 402 444 - 468 : CCTGGCTCTAATACAGTCGGGGGA
 403 444 - 467 : CCTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
 404 444 - 466 : CCTGGCTCTAATACAGTCGGGG
 405 444 - 465 : CCTGGCTCTAATACAGTCGGG
 406 443 - 467 : TCCTGGCTCTAATACAGTCGGGGG
 407 443 - 466 : TCCTGGCTCTAATACAGTCGGGG
 408 442 - 466 : ATCCTGGCTCTAATACAGTCGGGG
 409 442 - 465 : ATCCTGGCTCTAATACAGTCGGG
 410 441 - 465 : AATCCTGGCTCTAATACAGTCGGG
 411 441 - 464 : AATCCTGGCTCTAATACAGTCGG
 412 440 - 463 : AAATCCTGGCTCTAATACAGTCGG
 413 197 - 213 : TTCGGGCTCGCGCTAT
 414 196 - 214 : CTTGGGCTCGCGCTATA
 415 196 - 212 : CTTGGGCTCGCGCTA
 416 195 - 213 : CCTCGGCTCGCGCTAT
 417 195 - 211 : CCTCGGCTCGCGCT
 418 194 - 214 : ACCTCGGCTCGCGCTATA
 419 193 - 214 : GACCTCGGCTCGCGCTATA
 420 193 - 213 : GACCTCGGCTCGCGCTAT

【0039】

【表23】

【0038】

【表22】

*

421 193 - 211 : GACCTTCGGGCTCGCGCT
 422 192 - 213 : GGACCTTCGGGCTCGCGCTAT
 423 192 - 208 : GGACCTTCGGGCTCGC
 424 188 - 211 : CGGGGACCTTCGGGCTCGCGCT
 425 187 - 211 : GCGGGGACCTTCGGGCTCGCGCT
 426 186 - 210 : AGCGGGGACCTTCGGGCTCGCGC
 427 186 - 209 : AGCGGGGACCTTCGGGCTCGCG
 428 186 - 208 : AGCGGGGACCTTCGGGCTCGC
 429 186 - 207 : AGCGGGGACCTTCGGGCTCG
 430 174 - 197 : TCTACGGATGAAAGCGGGGACCT
 431 88 - 111 : CGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATA
 432 83 - 106 : GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAG
 433 82 - 103 : TGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT
 434 81 - 104 : CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTG
 435 81 - 102 : CTGGTGGCGAGTGGCGAACGGG
 436 80 - 103 : CCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT
 437 80 - 101 : CCTGGTGGCGAGTGGCGAACGG

標識物および固相担体と結合可能な部位

このような、プライマーまたはプローブとして利用可能な核酸断片または部分塩基配列は、必要なら標識物または固相担体と結合可能な部位が導入されていてもよい。ここで、プライマーを利用した検出を行う場合、標識物または固相担体と結合可能な部位を導入してよい位置はプライマーの伸張反応を妨げない位置ならばどこでもよいが、可能であれば5'末端は最も好ましい。またプローブを利用した検出を行う場合なら、標識物または固相担体と結合可能な部位を導入してよい位置は3'末端や5'末端の水酸基部分さらには塩基部分やリン酸ジエステル部分などが考えられるが、プローブの塩基配列や長さなどを考慮し、ハイブリダイゼーションの妨げにならないようにすることが望ましい。

【0040】上記核酸をプローブまたはプライマーとして利用する場合、標識物として、放射性物質、非放射性物質のどちらを用いてもよい。非放射性の標識物としては、直接標識可能なものとしてフルオレセイン誘導体、ローダミンおよびその誘導体などの蛍光物質、化学発光物質、遅延蛍光物質などがあげられる。

【0041】また、標識物と特異的に結合する物質を利用し間接的に標識物を検出することも可能である。こうした標識物としてはビオチン、ハプテンなどがあげられ、ビオチンの場合アビジンあるいはストレプトアビジンを、ハプテンの場合はこれに特異的に結合する抗体を利用する。ハプテンとしては2,4-ジニトロフェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンなどを使うことができる。これらの標識物はいずれも単独あるいは必要に応じて複数種を組み合わせて、プローブまたはプライマーに導入可能である。

【0042】サンドイッチハイブリダイゼーションなど核酸の特定断片を固相担体に特異的に結合する必要がある場合は、固相担体と結合可能な部位は、該担体と選択的に結合可能なものであれば何であってよい。たとえば、ビオチンあるいはフルオレセイン、2,4-ジニトロフェニル基を有する化合物やジゴキシゲニンなどのハプテンがあげられ、これらはいずれも単独あるいは必要に応じて複数種を組み合わせて、プローブまたはプライマーに導入可能である。

【0043】プローブを用いた検出法

プローブを用いた本発明によるP. cepacia KK01株の検出法は、前記核酸断片の塩基配列を有する核酸断片であって、標識物または(および)固相担体と結合可能な部位が導入されている場合もある核酸断片よりなるプローブの少なくとも1種を用いることを特徴とするものである。

【0044】一般的にプローブを用いた検出法としては、ドットハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、in situ ハイブリダイゼーションがあり、これらのいずれでも上記標識核酸断片を使用

し、常法どおりハイブリダイゼーションを行うことができる。

【0045】近年、ハイブリダイゼーションの感度をあげるために1細胞あたり多数のコピーが存在するrRNAを検出ターゲットとする方法が開発されているが、本発明における核酸断片は16S rRNAをコードする領域を含む核酸断片であり、同様の手法でrRNAの検出に供することができる。

【0046】また、in situ ハイブリダイゼーションにおいても、一般にrRNAを検出ターゲットとすることでS/N比のよい検出が可能であるが、上記同様に本発明における核酸断片を検出に供することが可能である。

【0047】また、操作の簡易化のためにサンドイッチハイブリダイゼーションを基本とする方法が開発されており、これらの方法によっても本発明における核酸断片を利用してP. cepacia KK01株の検出を行うことができる。

【0048】プライマーを用いた検出法

プライマーを用いた本発明によるP. cepacia KK01株の検出法は、前記核酸断片の塩基配列を有する核酸断片であって、標識物または(および)固相担体と結合可能な部位が導入されている場合もある核酸断片よりなるプライマーの少なくとも1種を用いることを特徴とするものであり、より好ましい例としては、後述するような2種の異なるプライマーによる遺伝子増幅反応により試料中の微量核酸断片を増幅するPCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた検出法である。

【0049】ここで2種のプライマーの基本的な形態としては、たとえば、2種のプライマーともに何の修飾もされていないもの、2種のプライマーのうち少なくとも一方に検出可能な標識または固相担体と結合可能な部分が導入されたもの、2種のプライマーのうち一方に標識物が導入され、他方に固相担体と結合可能な部位が導入されたもの、2種のプライマーともに固相担体と結合可能な部分が導入されたもの、などがあげられる。

【0050】本発明によるP. cepacia KK01株の検出方法は前記したような本発明によるプライマー、好ましくは2種の組み合わせからなるプライマーを用いて以下のように実施することができる。

(1) P. cepacia KK01株の有無を検出したい試料を準備し、(2) 必要に応じて、試料中の菌体の破碎処理を行い、(3) 試料に上記プライマーを加えプライマーの伸張反応を行い、(4) 工程(3)で得られた伸張反応物について検出操作を行う。

【0051】ここで、プライマー伸張反応により増幅された核酸断片の検出は、電気泳動、あるいはハイブリダイゼーションなどの通常用いられる方法を利用してもよいし、遺伝子の増幅反応においてそれぞれのプライマー

31

に別々の標識を導入しておき、増幅反応後生成物を固相担体に吸着し、生成物を選択的に検出する方法などを用いることも可能である。

【0052】ここで固相担体としてはポリスチレンボール、アガロースビーズ、ポリアクリルビーズ、ラテックス、マイクロタイターウェルなどの固相材料に、プライマー中に導入された結合部位を捕捉できるようなもの例えば、ストレプトアビジン、抗体などを導入したものがあげられる。たとえば、ビオチンが導入されたプライマーからのPCR産物を捕捉するには、ストレプトアビジン

を固相に結合した担体が、フルオレセインなどが導入されたプライマーからの伸張反応物を捕捉するには、それぞれに対する抗体を固相に結合した担体を用いられる。【0053】さらに、固相担体を微粒子とすることにより、目的とする核酸を凝集、あるいは沈殿の有無により簡便に判定することもできる。また、一方のプライマーには固相担体と結合可能な部位を、他方のプライマーには標識物を導入したものをそれぞれ用いて、伸張反応を行った反応物を固相担体と接触させた後に不純物を適当な溶媒で洗浄除去する方法もあり、目的核酸は標識物

を持つ形で該固相担体に固定され特異的に検出される。【0054】これら標識物質の実際の検出には、使用する標識物質に応じて一般的な手法を用いればよい。たとえば、標識物質がラジオアイソトープであれば、そのまま活性を測定すればよいし、たとえばビオチンであればアビジン-酵素結合体、また、ハプテンであれば抗体-酵素結合体などを用いてAMPDPなどの基質と反応させ、光学的、蛍光的手段により検出を行えばよい。

【0055】また、遺伝子の増幅反応に用いる酵素、反応条件などについてはさまざまな方法が考案されているが、本発明における核酸断片は、種々のPCR法に利用するのに十分な長さおよび塩基配列を持ち、これを用いることで*P. cepacia* KK01株の検出を確実簡便に行うことができるものである。

【0056】

【実施例】

【実施例1】 *P. cepacia* KK01株の16S rRNA遺伝子のクローニングと塩基配列の決定
既知のグラム陰性好気性菌 (*Pseudomonas testosteroni*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes xylosoxidans* および *Alcaligenes faecalis*) からの16S rRNAを得て、以下の2つの共通塩基配列を選び出した。

【0057】配列1: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'

配列2: 5' GTGTCGTGAGATGTTGGGT3'

上記配列について、配列1については主鎖を、配列2についてはその相補鎖を合成した。これらの合成したDN

32

Aをプライマーとして、*P. cepacia* KK01株のDNAを用いてPCRを行った。生成した約1100塩基対のDNA断片を、プラスミドpUC119のHincII切断部位に挿入し、大腸菌JM109を形質転換した。

【0058】形質転換株を、アンピシリン、IPTG、X-galを含む寒天培地上で選択し、生じた白色コロニーよりプラスミドを調製し、挿入断片の有無を調べた。約1100塩基対のDNA断片が挿入されている組み換えプラスミドを選択し、上記PCR断片の末端の塩基配列をダイデオキシ法により決定した。これを既知の各種細菌の16S rRNAの塩基配列と比較したところ、非常に相同性が高く、この挿入断片は*P. cepacia* KK01株の16S rRNA部分配列であると推定した。

【0059】PCRを経由しない、完全長の16S rRNA遺伝子のクローニングを以下のように行った。*P. cepacia* KK01株のDNAを制限酵素Sau3AIで部分分解し、アガロースゲル電気泳動により9~23キロ塩基対断片を分離、精製し、これらのDNA断片をλDASHII (STRATAGENE) のBamHI消化物に挿入した。GigapackII Gold extract (STRATAGENE) を用いて、インビトロパッケージング法によりファージ粒子の調製を行い、DNAライブラリーを作製した。ここで、上記16SrRNA遺伝子部分断片をプローブとして、該DNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法により陽性ファージのスクリーニングを行った。陽性ファージは500個に1個程度の割合で取得できた。常法により陽性ファージを培養の後、塩化セシウム密度勾配法によりファージDNAを精製した。

【0060】塩基配列の決定は段階欠失クローンと、16S rRNA遺伝子内の制限酵素切断部位を利用して得たサブクローンをを用いて行った。欠失は、プラスミドpUC119のHincII切断部位に完全長の16S rRNA遺伝子をリクローニングの後、ExonucleaseIIIとMung Bean Nucleaseにより段階的に導入した。これらの段階欠失クローンおよび制限酵素を利用したサブクローンをを用いて、ダイデオキシ法により塩基配列の決定を行った。こうして決定された*P. cepacia* KK01株の16S rRNAの塩基配列は、配列番号1の塩基配列である。

【0061】【実施例2】 プライマーの調製
本発明において、標識物あるいは固相担体と結合可能な部位が導入されているプライマー、あるいは導入されていないプライマーは、以下に示す化学合成法により調製した。

【0062】まず、標識物あるいは固相担体と結合可能な部位がいずれも導入されていないものは、DNA自動合成機 (Applied Biosystems In

c. モデル381A)を用いて、ホスホアミダイト法により0.2 μ molスケールで合成を行い、OPCカートリッジ(Applied Biosystems Inc.)により精製した。

【0063】また、標識物あるいは固相担体と結合可能な部位が導入されているプライマーは、まずその5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドとして合成し、その後に適当な試薬を用いて標識物あるいは固相担体と結合可能な部位を導入した。以下にその例を示す。

【0064】5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチド(5'-AAATCCTTGGCTCTAATACAGTCG-3')の合成は、上述したような合成反応により5'末端に最後の塩基(この場合はA)を付加した後、アミノリンクIITM(Applied Biosystems Inc.)をさらに付加することにより行い、合成終了後、OPCカートリッジにより精製した。

【0065】ビオチン化は、以下のようにして行った。10. D. のアミノ化オリゴヌクレオチド水溶液10 μ lに、1MNaHCO₃水溶液10 μ l、水30 μ l、および20 μ g/ μ lのビオチン- α -ヒドロキシサクシニミドエステル(BRL)のDMF溶液を50 μ l加え、混和後室温で放置した。4時間後、セファデックスG-50を担体としたゲルろ過にかけ、50mM TEAB(重炭酸トリエチルアンモニウム)緩衝液(pH7.5)で溶出し、最初のピークを集め乾固の後、TE緩衝液(pH8.0)に溶解した。

【0066】5'末端にジニトロフェニル基(DNP)を導入したオリゴヌクレオチド(5'-AGCACTCCACCTCTCAGCAG-3')は、ビオチン標識のときと同様に、まずその5'末端にアミノ基を導入したオリゴヌクレオチドとして合成および精製を行った。このようにして得た20. D. のアミノ化オリゴヌクレオチド水溶液180 μ lに、1MNaHCO₃水溶液20 μ lを加え、これに5%(v/v)ジニトロフルオロベンゼンのエタノール溶液100 μ lを加え37℃で2時間加温し、反応を行った。精製は、ビオチン化オリゴヌクレオチドと同様にゲルろ過により行い、乾固の後、TE緩衝液(pH8.0)に溶解した。

【0067】【実施例3】プローブの調製
3'末端にビオチン標識を導入したオリゴヌクレオチド(5'-ACTGTATTAGAGCCAAGGATTCTTTTCCGGACAA-3')を調製した。あらかじめ3'末端がビオチン標識されている、0.5 μ molスケールの3' Biotin-ON CPGカラム(CLONTECH)を用いて、ホスホアミダイト法によりオリゴヌクレオチドを合成し、常法によりOPCカートリッジを用いて精製、乾固の後、TE緩衝液(pH8.0)に溶解した。

【0068】【実施例4】プライマーの特異性の評価

P. cepacia KK01株、*P. putida* BH株、*P. aeruginosa* (IFO 3080)、*P. fluorescens* (IFO 14160)、*Alcaligenes faecalis* (IFO 14479)、*Xanthomonas maltophilia* (IFO 14161)、*Enterobacter cloacae* (IFO 13535)、*E. coli* JM109株の8種の細菌を用いて、常法により各種細菌よりDNAを調製したものを試料とし、PCR法によりプライマーの特異性を評価した。

【0069】プライマーは実施例2で調製した2種のプライマー(5'-Biotin-AAATCCTTGGCTCTAATACAGTCG-3'、5'-DNP-AGCACTCCCACCTCTCAGCAG-3')を用いた。PCRは、以下の反応溶液組成ならびに条件で行った。

【0070】50 μ mol/ μ l濃度の上記プライマーをそれぞれ1 μ lずつ、酵素に添付の反応緩衝液を5 μ l、酵素に添付のdNTP混合溶液を5 μ l、試料DNAを10ng加え、さらに水を加えて反応溶液全量を50 μ lとした。これに、Ampli Taq DNA polymerase(宝酒造)を1unit加え、90℃に加温して5分間保持した後、90℃・60秒、55℃・45秒、72℃・90秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行い、反応後さらに72℃で5分間保温した。反応後、50 μ lより10 μ lを分取し、アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色を行い、増幅核酸鎖の検出を行った。その結果、*P. cepacia* KK01株においてのみ、期待される約580塩基対の長さ、明瞭な一本のバンドが確認できた。ここで、他の7種の菌株においては、いかなる増幅核酸鎖もまったく検出することはできなかった。

【0071】【実施例5】*P. cepacia* KK01株のプライマーを用いた検出(1)
実施例4と同様に、8種類の各種細菌よりDNAを調製した。これを以下の反応溶液組成、反応条件でPCRに供した。

【0072】実施例2で調製した、20 μ mol/ μ l濃度のプライマー(5'-Biotin-AAATCCTTGGCTCTAATACAGTCG-3'、5'-DNP-AGCACTCCCACCTCTCAGCAG-3')をそれぞれ1 μ lずつ、酵素に添付の反応緩衝液を5 μ l、酵素に添付のdNTP混合溶液を2 μ l、試料DNAを*P. cepacia* KK01株は10pgを、他の細菌については10ngを加え、さらに水を加えて反応溶液全量を50 μ lとした。これに、Ampli Taq DNA polymerase(宝酒造)を1unit加え、90℃に加温して5分間保持した後、90℃・60秒、55℃・45秒、72℃・90秒

35

を1サイクルとした35サイクルの反応を行い、反応後さらに72℃で5分間保温した。

【0073】ストレプトアビジン固定化マイクロプレートに、0.15M NaCl、0.05% Tween 20を含むTris-Cl緩衝液(pH7.5)を100μl加えておき、これに反応後の上記混合液を10μl加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500μlで3回洗浄した。これにアルカリ性フォスフォターゼ標識抗DNP抗体を上述の緩衝液で2000倍に希釈したも*

36

*のを100μl加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500μlで3回洗浄した。これに、4mg/mlの濃度で1Mジエタノールアミン緩衝液に溶解した、p-ニトロフェニルリン酸溶液を100μl加え、室温30分間放置の後、マイクロプレートリーダーを用いて405nmの吸光度を測定した。結果を表1に示す。

【0074】

【表24】

試 料	吸光度
<i>P. cepacia</i> KK01株	0.854
<i>P. putida</i> BH株	0.003
<i>P. aeruginosa</i> (IFO 3080)	0.001
<i>P. fluorescens</i> (IFO 14160)	0.001
<i>Alcaligenes faecalis</i> (IFO 14479)	0.004
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (IFO 14161)	0.001
<i>Enterobacter cloacae</i> (IFO 13535)	0.002
<i>E. coli</i> JM109株	0.001

【実施例6】 *P. cepacia* KK01株のプライマーを用いた検出(2)

実施例4と同様にして、*P. cepacia* KK01株よりDNAを調製した。これを以下の反応溶液組成、反応条件でPCRに供した。

【0075】実施例2で調製した、20pmol/μl濃度のプライマー(5'-Biotin-AAATCC TTGGCTCTAATACAGTCG-3'、5'-DNP-AGCACTCCCACCTCTCAGCAG-3')をそれぞれ1μlずつ、酵素に添付の反応緩衝液を5μl、酵素に添付のdNTP混合溶液を2μl、試料として*P. cepacia* KK01株より調製したDNAを、10pg、1pg、100fg、10fg加え、さらに水を加えて反応溶液全量を50μlとした。これに、Ampli Taq DNA polymerase(宝酒造)を1unit加え、90℃に加温して5分間保持した後、90℃・60秒、55℃・45

※秒、72℃・90秒を1サイクルとした40サイクルの反応を行い、反応後さらに72℃で5分間保温した。

【0076】ストレプトアビジン固定化マイクロプレートに、0.15M NaCl、0.05% Tween 20を含むTris-Cl緩衝液(pH7.5)を100μl加えておき、これに反応後の上記混合液を10μl加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500μlで3回洗浄した。これにアルカリ性フォスフォターゼ標識抗DNP抗体を上述の緩衝液で2000倍に希釈したものを100μl加え、室温30分間放置の後、上記緩衝液500μlで3回洗浄した。これに、4mg/mlの濃度で1Mジエタノールアミン緩衝液に溶解した、p-ニトロフェニルリン酸溶液を100μl加え、室温30分間放置の後、マイクロプレートリーダーを用いて405nmの吸光度を測定した。結果を表2に示す。

【0077】

【表25】

P. cepacia KK01株DNA	吸光度
10pg	0.920
1pg	0.702
100fg	0.253
10fg	0.079
0	0.001

【実施例7】 *P. cepacia* KK01株のプロープを用いた検出(1)

実施例4と同様にして、8種類の各種細菌よりDNAを調製した。それぞれのDNAをアルカリ変性の後、ドットプロット装置(BRL)を用いて1 μ gずつナイロン膜(Tropilon-45、Tropix社)にドットした。80℃で2時間乾燥の後、ナイロン膜をビニールバッグに入れ、プレハイブリダイゼーション溶液(6 \times SSC、5 \times デンハルト溶液、0.5%SDS、100 μ g/ml変性サケ精子DNA)を3ml加え、60℃でプレハイブリダイゼーションを1時間行った。これに、ハイブリダイゼーション溶液(プレハイブリダイゼーション溶液に実施例3で調製したビオチン標識オリゴヌクレオチドプローブ(5'-ACTGTATTAGAGCCAAGGATTTCTTTCCGGACAA-Biotin-3')を熱変性の後に100ng加えたもの)を3ml加え、60℃で2時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜をビニールバッグより取り出し、6 \times SSC、0.5%SDS溶液を用いて60℃で5分間ずつ3回洗浄した。検出はサザンライト(Tropix社)を用いて、アルカリ性フォスファターゼ標識ストレプトアビジンとAMPPDTMによる化学発光法を利用して、添付のプロトコルに従い行った。

【0078】その結果、*P. cepacia* KK01株DNAをドットしたものについてのみ、きわめて強い陽性の反応を確認できた。ここで、他の7種の菌株においては、陽性の反応を検出することはできなかった。

【0079】【実施例8】 *P. cepacia* KK01株のプロープを用いた検出(2)

実施例4に記載の8種類の各種細菌を常法により培養した。0.1Mりん酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)で洗浄の後、前記緩衝液を用いてそれぞれの菌数が2 \times 10⁷ cells/mlになるよう調製した。このようにして調製した菌懸濁液50 μ lに6%のホルムアルデヒド溶液を50 μ l加え菌体を固定し、0.1%ゼラチン、0.01%クロムミョウバンでコートしたスライドグラスに30 μ lを滴下し、風乾した。試料を固定した*50

*スライドグラスを、90%メタノール、3%ホルムアルデヒド溶液に10分間浸けて菌体を再固定した後、純水で洗浄した。

【0080】上記処理を行ったスライドグラスを、50mM NaBH₄を含む10mM Tris-Cl緩衝液(pH8.0)に室温で30分間、遮光状態で浸した後、純水で洗浄、風乾した。プローブは実施例3で調製したビオチン標識オリゴヌクレオチドプローブ(5'-ACTGTATTAGAGCCAAGGATTTCTTTCCGGACAA-Biotin-3')に、FITC(Fluorescein isothiocyanate)標識されたストレプトアビジンをあらかじめ結合させたものを用いた。この標識プローブを、ハイブリダイゼーション溶液(0.1M Tris-Cl緩衝液(pH8.0)、0.75M NaCl、5mM EDTA、10%硫酸デキストラン、0.2%BSA(Bovine Serum Albumin)、0.01%ポリアデニル酸)で5ng/ μ l濃度とし、30 μ lを滴下した。スライドグラスを気密性の容器に入れて、45℃、1時間の反応を遮光状態で行った。

【0081】反応後、SET緩衝液(Tris-Cl(pH8.0)、0.2mM EDTA、30mM NaCl)でスライドグラスを洗浄し、遮光状態で風乾の後、オリンパスの落射型蛍光顕微鏡で検鏡を行い蛍光の有無を調べた。励起光源は水銀ランプを使用し、B励起により観察を行った。検鏡の結果、*P. cepacia* KK01株については菌体に蛍光が認められたが、他の細菌では蛍光を観察することはできなかった。

【0082】

【発明の効果】本発明の核酸断片は、*P. cepacia* KK01株の16S rRNAをコードする遺伝子であり、これらの構成塩基またはその一部分の塩基配列をプライマーまたはプローブとして利用すれば、*P. cepacia* KK01株の検出を特異的に行うことができる。

【0083】また、本発明による*P. cepacia* KK01株の検出方法は、上記の核酸断片あるいはこれ

らの一部をプライマーまたはプローブとして用いるものであり、感度、特異性、簡便さ、迅速性の点で優れたものであり、環境浄化などの分野で多大な貢献をなすものである。

【0084】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1526

* 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：rRNA遺伝子DNA

起源

生物名：Pseudomonas cepacia

株名：KK01

* 配列

```

1 : AGAGTTTAACTCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATG
51 : CAAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGACCTGGTGGCGAGTGGCGAACG
101 : GGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGCGAA
151 : AGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCG
201 : GGCCTCGGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
251 : AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACGAGC
301 : CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
351 : GAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCTGTGTGA
401 : AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATCCTTGGC
451 : TCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAAC
501 : TACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT
551 : TACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTAAAGACCGATGTGAAATC
601 : CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGG
651 : CAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
701 : AGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCAATACTGACGCTCATG
751 : CACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
801 : CTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCACTTCTTAGTAACGTAGC
851 : TAACGCGTGAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTC
901 : AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAATC
951 : GATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGCT
1001 : GAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACC GGCGCACAGGTGCTGCATGGCT
1051 : GTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCA
1101 : ACCCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTTAAGGAGACTGCCGGTG
1151 : ACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGG
1201 : GTAGGGCTTCACACGTACATAAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACCCG
1251 : CGAGGGGGAGCTAATCCAGAAAAACGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTG
1301 : CAACTCGAGTGCAAGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
1351 : CGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTTGTACACACCGCCCGTACACCATGG
1401 : GAGTGGGTTTTACAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCAC
1451 : CACGGTAGGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCG
1501 : GAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

```

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

(C12N 15/09

C12R 1:38)

(C12Q 1/68

C12R 1:38)

識別記号

ZNA

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12R 1:38)